

# 苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素、芽孢及苏云金素 A 对棉铃虫毒性及拒食性的比较

张继红, 王琛柱\*

(中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 苏云金杆菌库斯塔克变种 HD-1 的晶体蛋白与芽孢、HD-1 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 的芽孢以及苏云金素 A 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 毒性和拒食性的比较研究显示, HD-1 晶体蛋白对棉铃虫的杀虫毒力高, 拒食作用强; HD-1 芽孢对棉铃虫具有一定的杀虫活性和生长抑制作用, 并有很强的拒食作用; HD-1 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢对棉铃虫无毒也无拒食作用; 苏云金素 A 对棉铃虫的生长发育有极显著的抑制作用, 但对棉铃虫无拒食作用, 由此证明晶体蛋白是苏云金杆菌杀虫活性和拒食作用的主要来源。苏云金素 A 与苏云金杆菌芽孢晶体混合物一起使用, 可使棉铃虫的死亡率显著提高。

**关键词:** 棉铃虫; 苏云金杆菌; 毒性; 拒食性

**中图分类号:** Q965.9

**文献标识码:** A

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是目前应用最广泛的昆虫病原微生物。它不仅具有杀虫活性, 而且对很多昆虫具有显著的拒食作用<sup>[1,2]</sup>, 后者在一定程度上影响到 Bt 的杀虫毒效。Bt 的致病因子主要包括晶体蛋白 (即  $\delta$ -内毒素)、芽孢和  $\beta$ -外毒素, 有研究表明, 芽孢和  $\beta$ -外毒素的存在可提高晶体蛋白对昆虫的致病力<sup>[3~6]</sup>, 但三者对昆虫拒食性的大小直接关系到昆虫对 Bt 摄入量的大小, 影响 Bt 的杀虫效果。鉴于各因子的毒性和拒食性的关系目前尚缺乏系统的比较, 为提高 Bt 的杀虫效果, 我们主要以目前生产上常用的 HD-1 菌株和田间重要害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 为材料, 对晶体蛋白、芽孢以及苏云金素 A 的毒性和拒食性进行了比较研究, 并探讨了苏云金素 A 与苏云金杆菌芽孢晶体混合物的协同增效作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

试虫: 棉铃虫为室内人工饲养多代的标准试虫。养虫和试验条件为 27℃、相对湿度 75%、光照时间 15 h。成虫饲以 10% 的蜂蜜水溶液, 卵产于纱布上。幼虫以人工饲料饲养,

基金项目: 国家自然科学基金 (39900099) 和中国科学院重点项目 (KZ952-S1-109)

\* 通讯作者

收稿日期: 1999-07-22; 修订日期: 2000-01-26

饲料主要含有熟大豆粉、酵母粉、麦胚粉、抗坏血酸、对羟基苯甲酸甲酯、山梨酸、琼脂等成分。

菌种：苏云金杆菌库斯塔克变种 HD-1 和 HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 在 30℃ 培养箱中，以蛋白胨-牛肉膏固体培养基培养。HD-1 菌液经离心洗涤后，直接冰冻干燥，即为芽孢晶体混合粉；晶体的制备同 Zhang 等<sup>[7]</sup>，纯度达 99.23%；芽孢的制备同王瑛等<sup>[8]</sup>，其中 HD-1 芽孢纯度达 98.5%。HD-1 菌株和  $\beta$ -外毒素苏云金素 A 由中国科学院动物研究所昆虫病理组提供； $Cry^-$  菌株由美国加州大学河边分校昆虫学系吴栋博士提供。

## 1.2 毒性测定

HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢及苏云金素 A 分别以如下系列浓度：31.25  $\mu\text{g/mL}$ ，62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，125  $\mu\text{g/mL}$ ，250  $\mu\text{g/mL}$ ，312.5  $\mu\text{g/mL}$  及 375  $\mu\text{g/mL}$  掺入人工饲料中，每处理饲喂初孵幼虫 60 头，以正常人工饲料饲喂初孵幼虫 90 头作为对照。由于苏云金杆菌芽孢晶体制剂在田间的残效期约两天左右，我们在实验设计中只喂棉铃虫 2 日处理饲料，之后转至正常饲料上饲养，以测定棉铃虫取食 2 日处理饲料后对其生存和生长发育的后续效应。分别统计 2 日，5 日幼虫死亡率，称量幼虫 5 日及 12 日体重以反映各处理饲料对棉铃虫生长发育的短期和长期影响。校正死亡率参照 Abbot 方法计算<sup>[9]</sup>。

## 1.3 有食物选择试验

**1.3.1 4 龄幼虫的拒食指数测定：**处理饲料中，HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢及苏云金素 A 浓度均为 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，分别与对照正常饲料两两间隔置于 9cm 培养皿内，称取对照和处理饲料湿重。刚刚蜕皮的 4 龄幼虫饥饿 24 h 后放入培养皿内，每皿 1 头，每处理 15 个重复。培养箱内保持黑暗 48 h。取食前，皿内饲料的放入量应大于幼虫 48 h 内的最大消耗量，各处理间基本相等。48 h 后取出试虫，将培养皿放入 50℃ 培养箱内，待剩余饲料烘干后，称取饲料干重。每种饲料另取 4 块，用于测定饲料干湿比。测定幼虫 2 日取食干重量，计算拒食指数 ( $DI$ )。 $DI$  的计算公式： $DI = \text{处理饲料取食量} / (\text{对照饲料取食量} + \text{处理饲料取食量})$ 。

**1.3.2 初孵幼虫的趋性指数测定：**处理饲料设置：HD-1 晶体 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，12.5  $\mu\text{g/mL}$ ；HD-1 芽孢 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，312.5  $\mu\text{g/mL}$ ；HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，312.5  $\mu\text{g/mL}$ ；苏云金素 A 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ，312.5  $\mu\text{g/mL}$ ，分别与对照饲料两两间隔置于培养皿内。每皿放 5 头初孵幼虫，每处理 10 个重复。培养箱内保持黑暗 72 h，于每日 8:00 和 18:00 时统计幼虫所在位置，计算幼虫趋性指数 ( $TI$ )。 $TI$  的计算公式： $TI = \text{分布在处理饲料上的幼虫数} / (\text{分布在处理饲料上的幼虫数} + \text{分布在正常饲料上的幼虫数})$ 。

## 1.4 无食物选择试验

处理饲料中，HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢及苏云金素 A 的浓度均为 62.5  $\mu\text{g/mL}$ 。刚刚蜕皮的 4 龄幼虫饥饿 16 h，分别饲以正常饲料及上述处理饲料。每种饲料测试 9 头幼虫，每幼虫 1 min 观察一次，共观察 45 min。棉铃虫取食行为划分为取食、活动和休息三类，划分标准如下：取食——幼虫口器接触饲料并有取食动作；活动——包括爬行、身体前部伸展或摇摆、口器呈咀嚼状但不接触饲料；休息——幼虫呈静止状。

## 1.5 苏云金素 A 与 Bt 芽孢晶体混合物的协同杀虫作用

浓度为 0，31.25  $\mu\text{g/mL}$ ，250  $\mu\text{g/mL}$  的苏云金素 A 分别与浓度 0  $\mu\text{g/mL}$ ，31.25  $\mu\text{g/mL}$ ，

62.5  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$  的 Bt 芽孢晶体混合物混配于人工饲料中, 各处理初孵幼虫 60 头, 2 日后转喂正常饲料。分别统计幼虫 2 日, 5 日死亡率。

2 结果

2.1 毒性比较

饲喂 HD-1 晶体的棉铃虫组 (简称晶体组) 幼虫, 在 2 日和 5 日内均表现为高死亡率, HD-1 芽孢组也有死亡, 但死亡率较低; 而 Cry<sup>-</sup> 芽孢和苏云金素 A 组在 5 日内无幼虫死亡 (表 1)。苏云金素 A 组幼虫在 12 日后仅有不到 10% 的个体死亡。

表 1 棉铃虫取食含苏云金杆菌 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢和苏云金素 A 人工饲料的校正死亡率

浓度 Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	HD-1 晶体 HD-1 crystal		HD-1 芽孢 HD-1 spore		Cry <sup>-</sup> 芽孢 Cry <sup>-</sup> spore		苏云金素 A Thuringiensin A	
	2 日	5 日	2 日	5 日	2 日	5 日	2 日	5 日
	2nd Day	5th Day	2nd Day	5th Day	2nd Day	5th Day	2nd Day	5th Day
31.25	45.61	68.40	8.33	8.17	0	0	0	0
62.5	40.68	80.25	5.45	3.68	0	0	0	0
125	57.89	85.12	10.94	13.91	0	0	0	0
250	55.17	96.34	25.00	27.60	0.02	0	0	0
312.5	52.54	94.62	12.28	23.79	0	0	0	0
375	66.10	98.21	20.00	38.20	0.04	0	0	0

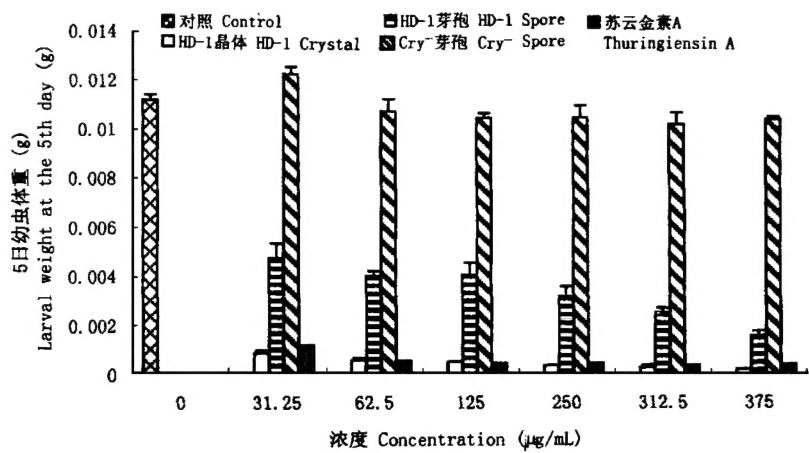


图 1 苏云金杆菌 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢和苏云金素 A 对棉铃虫幼虫生长发育的短期影响

Fig. 1 The short term effects of HD-1 Crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry<sup>-</sup> mutant spore and thuringiensin A from *B. thuringiensis* on the growth and development of *H. armigera* larvae

5 日后, 除芽孢 ( $Cry^-$ ) 组外, 各处理组幼虫的体重均显著降低。其中, 取食 HD-1 晶体和苏云金素 A 的幼虫体重均低于正常幼虫体重的 4% (图 1)。12 日后, HD-1 晶体组幼虫大部分已死亡; 苏云金素 A 组幼虫几乎没有生长, 呈现两头尖中间鼓的畸形体态; HD-1 芽孢组幼虫发育迟缓, 体重显著低于对照组幼虫; HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢组幼虫体重与对照组幼虫无显著差异 (图 2)。

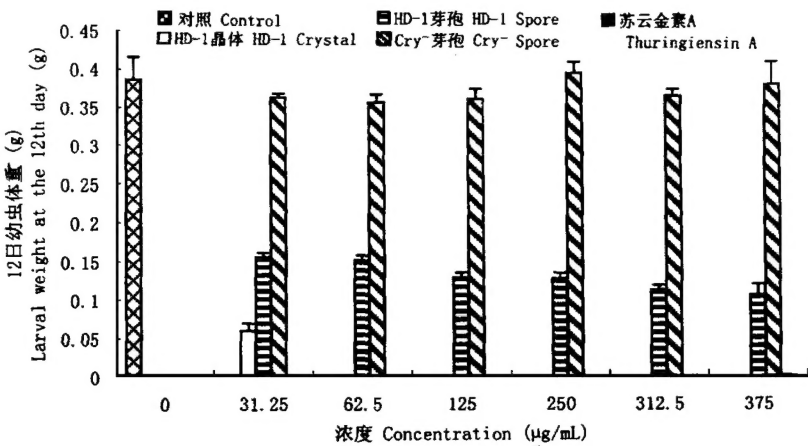


图 2 苏云金杆菌 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢和苏云金素 A 对棉铃虫幼虫生长发育的长期影响

Fig. 2 The long term effects of HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1  $Cry^-$  mutant spore and thuringiensin A from *B. thuringiensis* on the growth and development of *H. armigera* larvae

2.2 有食物选择条件下幼虫的取食反应

4 龄幼虫的拒食指数 (表 2) 和初孵幼虫在各处理饲料上的趋性指数 (表 3) 都表明, 棉铃虫对 HD-1 的晶体和芽孢有显著的拒食反应, 对  $Cry^-$  芽孢和苏云金素 A 无明显拒食反应。

表 2 选择性实验中 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 ( $Cry^-$ ) 芽孢和苏云金素 A 对棉铃虫 4 龄幼虫的拒食指数

Table 2 The deterrent index (DI) of the <i>H. armigera</i> fourth instar larvae against HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 $Cry^-$ mutant spore and thuringiensin A in the choice test				
	HD-1 晶体 HD-1 crystal	HD-1 芽孢 HD-1 spore	$Cry^-$ 芽孢 $Cry^-$ spore	苏云金素 A Thuringiensin A
拒食指数 (DI) (Mean ± SE)	0.248 ± 0.079	0.248 ± 0.072	0.468 ± 0.096	0.5494 ± 0.095

2.3 无食物选择条件下幼虫的取食行为反应

棉铃虫在含  $Cry^-$  芽孢、HD-1 芽孢和外毒素饲料上的取食次数与正常饲料无显著差异, 在含 HD-1 晶体饲料上的取食次数显著降低 (图 3)。

2.4 苏云金素 A 与 Bt 芽孢晶体混合物的协同杀虫作用

幼虫 5 日死亡率均高于 2 日死亡率。苏云金素 A 以 31.25 μg/mL, 250 μg/mL 单独作用,

幼虫 5 日死亡率分别为 0 和 1.8%。将苏云金素 A 与 Bt 芽孢晶体混合物一起使用，棉铃虫死亡率显著提高（图 4）。

表 3 选择性实验中棉铃虫初孵幼虫在处理饲料上的趋性指数  
Table 3 The tactic index (TI) of *H. armigera* neonates to the treated diets in the choice test

处理饲料 Treated diets ( $\mu\text{g/mL}$ )	1 日 1st Day		2 日 2st Day		3 日 3st Day	
	8:00*	18:00	8:00	18:00	8:00	18:00
HD-1 晶体 (HD-1 Crystal)						
62.5	0.179	0.188	0.121	0.034	0.148	0.154
12.5	0.233	0.143	0.029	0.108	0.194	0.240
HD-1 芽孢 (HD-1 Spore)						
62.5	0.180	0.200	0.227	0.195	0.207	0.286
312.5	0.294	0.111	0.119	0.132	0.206	0.194
Cry <sup>-</sup> 芽孢 (Cry <sup>-</sup> Spore)						
62.5	0.418	0.502	0.424	0.412	0.446	0.410
312.5	0.476	0.525	0.536	0.547	0.517	0.537
苏云金素 A (Thuringiensin A)						
62.5	0.429	0.500	0.436	0.343	0.476	0.350
312.5	0.351	0.300	0.323	0.441	0.474	0.393

\* 观察时间 (the time of observation)

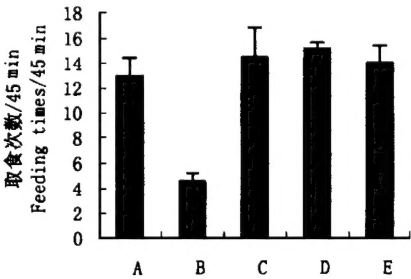


图 3 棉铃虫 4 龄幼虫对 HD-1 晶体、HD-1 芽孢、HD-1 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢和苏云金素 A 的取食行为反应

Fig. 3 The feeding behavior of the *H. armigera* fourth instar larvae on diets with HD-1 crystal, HD-1 spore, HD-1 Cry<sup>-</sup> mutant spore and thuringiensin A  
A. 对照 (Control); B. HD-1 晶体 (HD-1 crystal); HD-1 芽孢 (HD-1 spore); D. 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢 (Cry<sup>-</sup> mutant spore); E. 苏云金素 A (Thuringiensin A)

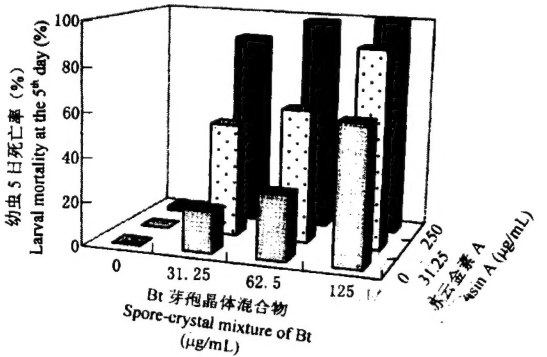


图 4 苏云金素 A 对 Bt 芽孢晶体混合物的增效作用

Fig. 4 The potentiation of thuringiensin A on the toxicity of spore-crystal mixture of Bt

3 讨论

上述研究结果显示，HD-1 晶体蛋白对棉铃虫的杀虫毒力最高，拒食作用也强，HD-1 芽

孢对棉铃虫具有毒性, 虽然其毒力较低, 但在选择性实验中对棉铃虫的拒食作用与晶体蛋白不相上下; 无晶体突变株 (Cry<sup>-</sup>) 芽孢对棉铃虫既没有毒性, 也没有拒食作用。有研究结果表明芽孢衣蛋白与晶体蛋白同源, 具有一定的杀虫活性<sup>[10-12]</sup>。Du 等 (1996)<sup>[13]</sup>报道,  $\delta$ -内毒素保守的 C-末端和芽孢衣蛋白质都含有丰富的半胱氨酸, 部分  $\delta$ -内毒素可通过二硫键附着在芽孢衣上。因此, 晶体是苏云金杆菌杀虫活性和拒食作用的主要来源。

苏云金素 A 虽然对棉铃虫无明显急性致死效应, 但对棉铃虫的生长发育有不可恢复的抑制作用, 即使在测试的最低浓度, 初孵幼虫的体重在 12 日内都没有明显的增长。苏云金素 A 对棉铃虫亦无明显拒食作用, 还可大幅度增强苏云金杆菌芽孢晶体混合物的杀虫毒力。苏云金素 A 和晶体蛋白在杀虫特性上具有互补性, 如苏云金素 A 作用效果比较缓慢, 但性质稳定, 持效时间较长, 对棉铃虫无拒食作用; 晶体蛋白的作用效果较快, 但性质不稳定, 残效期短, 对棉铃虫有强的拒食作用。因此, 将苏云金素 A 作为苏云金杆菌制剂的成分之一, 可提高对害虫的毒杀效果, 但在实际应用中, 由于苏云金素对脊椎动物有一定毒性, 应考虑到其安全性。目前一般认为, 在实际用于害虫防治的浓度下, 苏云金素不会对靶标生物和人类构成危险<sup>[14]</sup>, 有些国家已有商品制剂出售使用。

**致谢** 项秀芬女士和张书芳女士参与了部分生测工作, 谨致谢意。

## 参 考 文 献 (References)

- [1] Berdegué M, Trumble J T, Moar W J. Effect of CryIC toxin from *Bacillus thuringiensis* on larval feeding behavior of *Spodoptera exigua*. Entomol. Exp. Appl., 1996, 80: 389~401
- [2] Ramachandran R, Raffa K F, Miller M J *et al.* Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) toxin in diet. Environ. Entomol., 1993, 22: 197~211
- [3] Gardner W A. Enhanced activity of selected combinations of *Bacillus thuringiensis* and beta-exotoxin against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol., 1988, 81 (2): 463~469
- [4] 林开春. 苏云金素与苏云金杆菌芽孢晶体混剂对小菜蛾的增效作用. 植物保护学报, 1995, 22 (1): 27~32
- [5] Miyazono M, Inagaki S, Yamamoto M *et al.* Enhancement of  $\delta$ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus*   
 表 2 against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol., 1994, 63: 111~112
- heltlu A M, van Rie J *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protoxin to resistant diamond-   
 e 2 *Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 564~569
- J H, Wang C Z, Xiang X F *et al.* Effect of dissolution and degradation on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-   
 toxins to cotton bollworm. Entomologia Sinica, 1997, 4 (4): 357~363
- [8] 王 瑛, 白 成, 温 洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. 微生物学报, 1980, 20 (3): 285~288
- [9] Abbot W S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 1925, 18: 265~267
- [10] 李荣森, 罗 成. 苏云金杆菌伴孢晶体和芽孢衣的蛋白质组分及其与毒力的关系. 昆虫学报, 1989, 32 (2): 149~156
- [11] Fast P G. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In :Burges H D ed. Microbial Control of Pests and Diseases, 1970~1980. London: Academic Press, 1981. 223~248
- [12] Somerville H J, Delafied F P, Rittenberg S C. Biochemical homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 1968, 96: 721~726
- [13] Du C, Nickerson K W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized CryIAc toxin: physiological and pathogenic consequences. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 3 722~3 726

- [14] Marce F, Matha V, Weiser J. Analysis of the genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -exotoxin by means of the *Drosophila* wing spot test. J. Invertebr. Pathol., 1989, 53: 347~353

## Comparison of toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hübner)

ZHANG Ji-hong, WANG Chen-zhu\*

(National Key Laboratory of Integrated Management of Agricultural Insect Pests and Rodents,  
Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract:** A comparative study on the toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hübner) was carried out. The parasporal crystals of Btk HD-1 were highly toxic and feeding deterrent to *H. armigera* larvae. The spores of Btk HD-1 showed some insecticidal activity and highly feeding deterrence. The spores of a HD-1 mutant without crystal, Cry<sup>-</sup>, had no toxicity and feeding deterrence. The thuringiensin A greatly inhibited larval development, but had no feeding deterrence. In the no choice test, larval feeding was arrested by HD-1 crystals, but HD-1 spores, mutant Cry<sup>-</sup> spores and thuringiensin A had no effect on larval feeding during the 45 min observation. When the crystal-spore mixture is combined with thuringiensin A, larval mortality was greatly increased.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; *Bacillus thuringiensis*; toxicity; deterrence

\* Author for correspondence